

No.	22-1047	
研究課題名	呼吸器疾患を血管内皮細胞から考える-細胞形質転換の制御による内因性自己組織修復法の解明-	
研究代表者	関根 亜由美（ 千葉大学医学部付属病院 呼吸器内科学・准教授 ）	
研究組織	受入教員	岩間 厚志（ 東京大学医科学研究所・教授 ）
	分担者	中島 やえ子（ 幹細胞分子医学・助教 ）
	分担者	大島 基彦（ 幹細胞分子医学・助教 ）
	分担者	小出 周平（ 幹細胞分子医学・研究員 ）
	分担者	岩間 厚志（ 幹細胞分子医学・教授 ）

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業  
共同研究報告書 (年次終了・研究完了)【国内】

共同研究報告 (研究完了)

●研究目的:

特発性肺線維症や肺高血圧症等の慢性呼吸器疾患は持続炎症を背景とした組織の線維化や血管新生の異常リモデリングが病態形成に関与するといわれている。本研究では、肺循環系における内皮血球転換=EHTに注目し、内皮細胞を基軸としてこのEHTを司る、転写因子Runx1の機能解析から呼吸器系の血球系細胞、さらには間葉系細胞、気道上皮細胞との相互形質転換の分子メカニズムの解明と難治性呼吸器疾患に横断的に広く展開できる革新的ワクチンの基盤構築を行う。

●研究成果:

初めにRunx1<sup>+</sup>/VE-Cad<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>をEHT陽性肺血管内皮細胞と定義した。初めに*in vivo*で慢性低酸素暴露、及び低酸素暴露+Sugen5416(VEGF阻害薬)肺高血圧症等の疾患モデルマウスを作成し、FACSや遺伝子発現解析、組織免疫染色の手法を用いてEHT陽性細胞の肺組織での機能解析を行った。EHT陽性細胞は2つのモデルとも病勢に一致して有意に上昇していた一方、脾臓ではday7の急性期でRunx1発現が一過性に上昇し、その後は病勢に伴って定常状態に戻っていくこと、骨髄では病勢に一致してRunx1発現が下降していくことを確認した。病理組織学的解析ではマウス肺100  $\mu$ mの厚切り切片の立体構築画像にてEHT陽性細胞が特に毛細血管領域に有意に分布していることが明らかとなった。その後、より詳細な機能解析を行うためにRunx1-GFP標識遺伝子改変マウスを用いて低酸素暴露及び低酸素暴露+Sugen5416モデルを作成し、セルソーターを用いてRunx1陽性/陰性肺血管内皮細胞を採取し、*ex vivo*でのbulk-RNAシーケンス解析を行った。PCA解析では、Runx1陽性細胞群はコントロールやRunx1陰性細胞群と明確なプロファイルの差が確認した。(Figure. A)Volcano plotsでは各々344個および389個の有意にup及びdown regulateされた遺伝子が特定された。発現の変動比は小さいものの、発現量が増加した遺伝子の中では肺泡領域に特異的に発現するマーカー遺伝子であることが最近、明らかになっているCar4,Tbx2等が有意に変動していた。(Figure. B) これらは肺高血圧症の新しい原因遺伝子としても近年報告されている。また、GSEAを用いたエンリッチメント解析では炎症関連、上皮間葉転換、酸化ストレス関連遺伝子群が有意な変動遺伝子群として浮上した。(Figure. C) また、Gene Ontology解析ではup regulateされている遺伝子の機能の特徴として細胞遊走、細胞接合、細胞分化などのtermが上位に上がった一方、down regulateされている遺伝子の機能の特徴としてtube formation blood vessel developmentなど血管をキーワードとするtermが上位であった。(Figure. D) さらに、Runx1の転写因子としての挙動をより詳しく確認するため、刺激培養下でのCell lineのマウス肺血管内皮細胞のbulk-RNAシーケンス解析を行った。まず、1%低酸素刺激4時間の時点でコントロール群の肺血管内皮細胞群でも巨核球、血小板産生などを含むRunx1関連遺伝子セットがenrichされていることを確認した。続いて、Runx1ノックダウン操作後にday7まで培養を継続したところ、細胞増殖や抗アポトーシスに関与する遺伝子セットがdown regulateされ、低酸素刺激下にはT細胞受容体(TCR)シグナル伝達活性とT細胞増殖に関わる遺伝子セットがup regulateされていた。これらはRunx1の制御により、成体肺組織でも障害応答時に局所でEHTが起こりうる可能性が示唆されると考えている。以上は現在、論文化を鋭意進めているが、成熟内皮細胞から血球系細胞が直接リプログラミングにて生み出されているかどうか、内皮血球転換の本質について迫るには不十分であった。今後はシングルセル解析やオルガノイド培養実験などを用いて、次のステップへ展開していきたい。

Runx1陽性肺血管内皮細胞を用いたbulk-RNAseq 解析  
SuHx Runx1 positive PVECs(n=2) vs SuHx Runx1 negative PVECs(n=2)

